

Kornet daging sapi (*Corned beef*)



© BSN 2006

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Komposisi	1
4 Syarat mutu.....	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji.....	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif)Metode pengambilan contoh Kernet daging sapi (<i>Corned beef</i>)	4
Lampiran B(normatif) Cara uji parameter syarat mutu Kernet daging sapi	8
Bibliografi	34
Tabel A.1 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)	5
Tabel A.2 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)	6
Tabel A.3 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb).....	6
Tabel A.4 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)	6
Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)	7
Tabel A.6 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb).....	7
Tabel B.1 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkatpengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh	26

Prakata

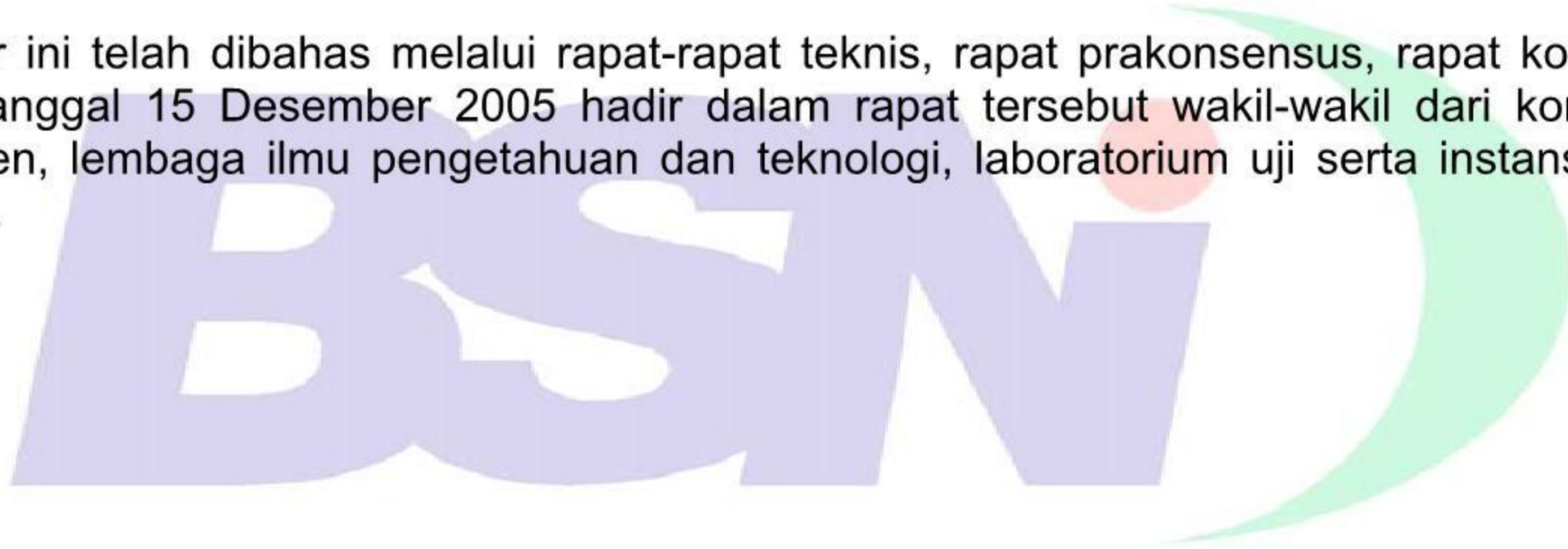
Standar Nasional Indonesia (SNI) *Kornet daging sapi (Corned beef)* ini merupakan revisi SNI 01-3775-1995 Corned beef dalam kaleng. Standar ini disiapkan oleh Panitia Teknis Makanan dan Minuman Departemen Perindustrian.

Maksud dan tujuan penyusunan standar ini adalah sebagai acuan sehingga kornet daging sapi yang beredar di pasar dapat menjamin mutu dan keamanannya.

Didalam merumuskan SNI ini tim telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam :

1. Undang-undang RI No.7 Tahun 1996 tentang Pangan
2. Undang-undang RI No.8 Tahun 1999 tentang perlindungan Konsumen.
3. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
4. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan.
5. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No.03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan.

Standar ini telah dibahas melalui rapat-rapat teknis, rapat prakonsensus, rapat konsensus pada tanggal 15 Desember 2005 hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari konsumen, produsen, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, laboratorium uji serta instansi terkait lainnya.



Kornet daging sapi (*Corned beef*)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji kornet daging sapi (*Corned beef*).

2 Istilah dan definisi

2.1

kornet daging sapi (*corned beef*)

produk yang dibuat dari potongan daging sapi segar atau beku, tanpa tulang, boleh dicampur dengan daging bagian kepala dan jantung yang memenuhi persyaratan dan peraturan berlaku, dengan atau tanpa penambahan bahan tambahan pangan yang diijinkan melalui proses *curing* dan dikemas dalam wadah kedap udara (*hermetis*) dan disterilkan

3 Komposisi

3.1 Bahan baku utama

Daging sapi.

3.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk kornet daging sapi yang sesuai dengan peraturan yang berlaku.

4 Syarat mutu

Syarat mutu kornet daging sapi sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 Syarat mutu kornet daging sapi

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
	Kemasan	-	normal (kemasan kaleng/plastik tidak bocor, tidak kembung dan tidak berkarat).
	Warna	-	Normal
	Bau	-	Normal
2	Lemak	% (b/b)	Maks. 12
3	Protein (N x 6,25)	% (b/b)	Min. 17
4.	Karbohidrat	% (b/b)	Maks. 5
5	Pengawet nitrit	mg/kg	Maks. 50

Tabel 1 (Lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
6	Cemaran logam		
	Tembaga (Cu)	mg/kg	Maks. 20,0
	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 1,0
	Seng (Zn)	mg/kg	Maks. 40,0
	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40/200*
	Raksa (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03
7	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks. 1
8	Cemaran mikroba		
	Bakteri <i>coliform</i>	APM	< 3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	0
	<i>Clostridium perfringens</i>	koloni/g	0
	<i>Clostridium botulinum</i>	koloni/g	0
	Bakteri aerob termofilik pembentuk spora	Koloni/g	Maks. 100
* kemasan kaleng			

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh seperti tercantum pada lampiran A.

6 Cara uji

Cara uji untuk semua parameter syarat mutu kornet daging sapi seperti di bawah ini :

- Cara uji keadaan seperti pada Lampiran B.2.
- Cara uji warna seperti pada Lampiran B.2.1
- Cara uji bau seperti pada Lampiran B.2.2
- Cara uji kadar lemak seperti pada Lampiran B.3
- Cara uji kadar protein seperti pada Lampiran B.4
- Cara uji karbohidrat seperti pada Lampiran B.5
- Cara uji nitrit seperti pada Lampiran B.6
- Cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran B.7
 - Cara uji tembaga (Cu), timbal (Pb), dan seng (Zn) seperti pada Lampiran B.7.1
 - Cara uji timah (Sn) seperti pada Lampiran B.7.2
 - Cara uji raksa (Hg) seperti pada Lampiran B.7.3
- Cara uji arsen (As) seperti pada Lampiran B.8
- Cara uji cemaran mikroba seperti pada Lampiran B.9
 - Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji *Coliform*, dan *Staphylococcus aureus* seperti pada Lampiran B.9.1
 - Cara uji bakteri *coliform* seperti pada Lampiran B.9.2
 - Cara uji bakteri *Staphylococcus aureus* seperti pada Lampiran B.9.3
 - Cara uji bakteri *Clostridium perfringens* seperti pada Lampiran B.9.4
 - Cara uji bakteri *Clostridium botulinums* seperti pada Lampiran B.9.5

- Cara uji bakteri aerob termofilik pembentuk spora seperti pada Lampiran B.9.6

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai butir 5.

8 Higiene

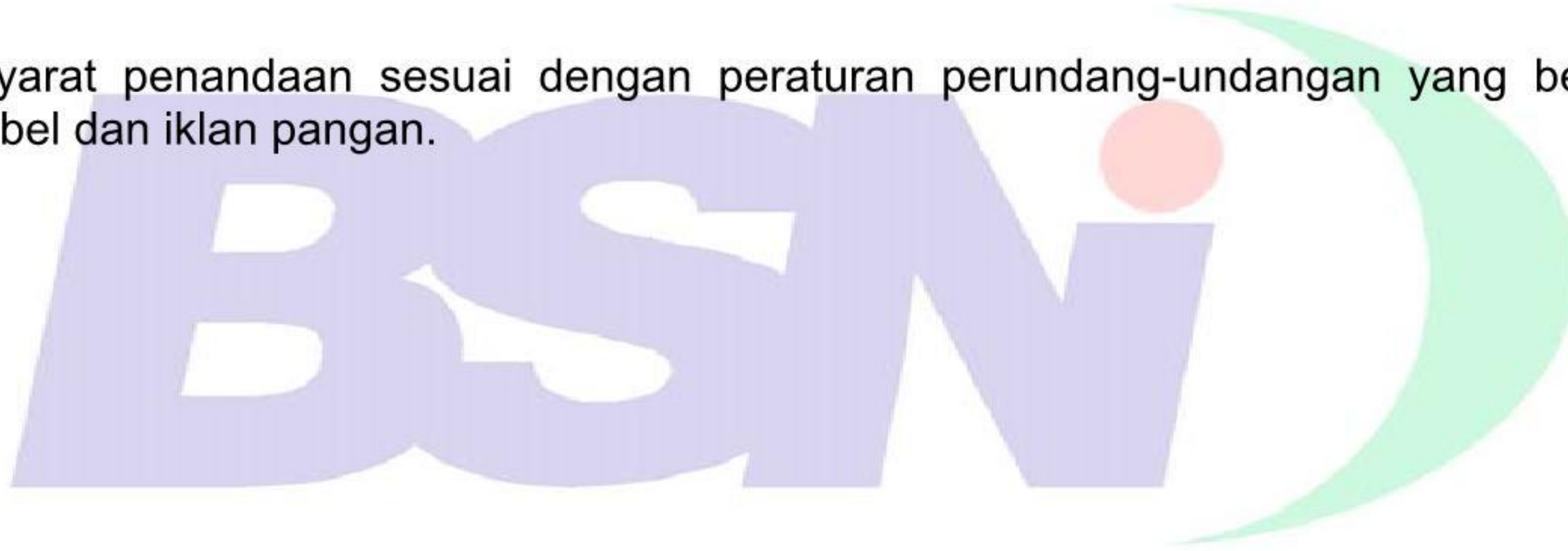
Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada peraturan yang berlaku, tentang pedoman cara produksi pangan yang baik untuk makanan.

9 Pengemasan

Kornet daging sapi dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A (normatif)

Metode pengambilan contoh Kernet daging sapi (*Corned beef*)

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh kernet daging sapi yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL 6,5 dan contoh diambil secara acak.

A.2 Penerapan pengambilan contoh

A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) Ukuran lot (N);
- c) Ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam kg dan lb);
- d) Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

A.2.2 Pemeriksaan

- a) pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih menyakinkan.
- b) tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil kernet daging sapi
- c) tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1.
- d) ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot
- e) uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar.
- f) gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A.
- g) nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c).

A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton yang berisi kemasan berukuran 12 x 340 g setiap kartonnya. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- a) Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b) Ukuran kemasan : 340 g
- c) Tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh contoh 1 A.3)
- d) Ukuran contoh (n) : 13
- e) Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a. Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b. Ukuran kemasan : 340 g
- c. Tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, A.3)
- d. Ukuran contoh (n) : 21
- e. Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, yang diterima sebanyak 4 dan 6 berturut-turut.

A.3 Rancangan pengambilan contoh

A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

Tabel A.2 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

Tabel A.3 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb)

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)

Tabel A.4 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

Tabel A.6 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb)

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19

Lampiran B (normatif)

Cara uji parameter syarat mutu Kornet daging sapi

B.1 Persiapan contoh

- a) Buka tutup kemasan kornet daging sapi dan giling kornet daging sapi menggunakan mixer;
- b) Simpan ditempat dingin sebelum diuji.

B.2 Keadaan

B.2.1 Warna

B.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisi terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan (mata).

B.2.1.2 Cara kerja

- a) buka tutup kemasan kornet daging sapi secara aseptis dan tebarkan diatas wadah yang bersih dan kering;
- b) amati warna contoh uji;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis, lanjutkan untuk uji bau

B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) jika terlihat warna khas kornet daging sapi maka hasil dinyatakan "normal" ;
- b) jika terlihat warna asing selain warna khas kornet daging sapi maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.2 Bau

B.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

B.2.2.2 Cara kerja

- b) buka tutup kemasan kornet daging sapi secara aseptis dan tebarkan diatas wadah yang bersih dan kering atau bisa digunakan contoh uji yang telah digunakan untuk uji warna;
- c) cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- d) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) jika tercium bau khas kornet daging sapi maka hasil dinyatakan "**normal**";

- b) jika tercium bau asing selain bau khas kornet daging sapi maka hasil dinyatakan “**tidak normal**”.

B.3 Lemak

B.3.1 Prinsip

Contoh uji daging dan produk daging yang telah dikeringkan diekstraksi dengan dua tahap perlakuan menggunakan pelarut non polar untuk lemak (petroleum eter atau heksana). Pelarut dapat dikumpulkan kembali dengan kondensasi. Ekstrak yang tertinggal dikeringkan dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

B.3.2 Perekaksi

- Petroleum eter atau heksana;
- Pasir;
- Kapas bebas lemak.

B.3.3 Peralatan

- Soxhlet atau seperangkat “*Soxtec System*” beserta cup ekstraksi;
- Pemanasan listrik yang dilengkapi dengan pendingin;
- Labu lemak 250 ml;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Selongsong kertas atau thimble;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1°C
- Pengaduk kaca;
- Desikator yang berisi desikan.

B.3.4 Cara kerja

- timbang dengan teliti 3 gram contoh kedalam selongsong kertas, tambahkan pasir dan aduk dengan pengaduk kaca;
- keringkan dalam oven pada suhu 125 °C selama 1 jam;
- keluarkan dari oven dan dinginkan;
- longgarkan selongsong kertas dengan pengaduk kaca, bersihkan pengaduk kaca tersebut dengan kapas dan masukkan kapas tersebut kedalam selongsong kertas;
- jika menggunakan soxtec system maka masukkan selongsong kertas tersebut ke dalam cup ekstraksi yang telah berisi batu didih dan telah ditimbang (W_0);
- ekstrak selongsong yang berisi contoh kering itu dengan 40 ml petroleum eter atau heksana pada posisi *boiling* selama 25 menit dan *rinsing* selama 30 menit.
- atur temperatur unit ekstraksi sehingga laju kondensasi ≥ 5 tetes/detik dan lanjutkan ke prosedur (k);
- Jika menggunakan soxhlet maka sumbat selongsong kertas dengan kapas kemudian masukkan ke dalam alat ekstraksi soxhlet yang telah dihubungkan dengan labu lemak. Labu lemak tersebut telah berisi batu didih dan telah dikeringkan serta telah diketahui bobotnya (W_0);
- ekstrak dengan petroleum eter atau heksana selama ± 6 jam;
- suilingkan petroleum eter atau heksana;
- keringkan ekstrak lemak dalam oven pada suhu 125 °C selama 30 menit;
- dinginkan dalam desikator selama 30 menit dan timbang hingga bobot tetap (W_1).

B.3.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

dengan;

W adalah bobot contoh, (g);

W₀ adalah bobot labu lemak atau cup ekstraksi, (g);

W₁ adalah bobot labu lemak atau cup ekstraksi dan residu, (g).

B.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar lemak atau deviasi (*RSD*) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau *RSD* lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.4 Protein (N×6,25)

B.4.1 Prinsip

Kornet daging sapi didestruksi dengan H₂SO₄ menggunakan CuSO₄.5H₂O sebagai katalis dan K₂SO₄ untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi NH₃ pada saat destilasi menggunakan NaOH. NH₃ yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein kornet daging sapi diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

B.4.2 Pereaksi

- Asam sulfat (H₂SO₄) pekat bebas nitrogen;
- Larutan katalis tembaga (CuSO₄.5H₂O) bebas nitrogen 0,05 g/ml H₂O;
Larutkan 5 g CuSO₄.5H₂O dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- Katalis selen;
Campurkan 4 g serbuk SeO₂, 150 g K₂SO₄ atau Na₂SO₄ dan 30 g CuSO₄.5 H₂O
- Kalium sulfat (K₂SO₄) bebas nitrogen;
- Batu didih;
- Larutan indikator *methyl red* (MR) dan *bromocresol green* (BCG);
Larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan asam borat, H₃BO₃ 4 %;
Larutkan 40 g H₃BO₃ dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red* dan *bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;
Larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- Larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %;
Larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.

- j) Larutan asam klorida, HCl 0,1M.
Pipet dengan hati-hati 8,60 ml HCl pekat (36.5–38%) kedalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

B.4.3 Peralatan

- Labu Kjeldahl 100 ml;
- Distilator dan kelengkapannya;
- Pemanas listrik/alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Buret 10 ml terkalibrasi.

B.4.4 Cara kerja

- timbang 2,0 g–2,2 g contoh ke dalam labu kjeldahl, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 ml larutan katalis $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ atau 1 g campuran katalis selen, 8-10 batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisap asap;
- Biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 ml larutan NaOH 30 %. (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- sulingkan selama 5 menit sampai 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H_3BO_3 4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- Titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 N;
- kerjakan penetapan blanko.

B.4.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 6,25 \times 100\%}{W}$$

dengan:

V_1 adalah Volume HCl 0,1 N untuk titrasi contoh (ml) ;

V_2 adalah Volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko (ml) ;

N adalah Normalitas larutan HCl ;

W adalah bobot contoh (mg) ;

14,008 adalah bobot atom Nitrogen.

6,25 adalah faktor protein daging dan produk daging

B.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

B.5 Nitrit

B.5.1 Pereaksi

- a) Pereaksi NED
Larutkan 0,2 g N-(1-naphthyl) ethylenediamine.2HCl dalam 150 ml 15 % (v/v) CH_3COOH . Saring jika diperlukandan simpan dalam botol berwarna coklat.
- b) Pereaksi Sulfanilamida
Larutkan 0,5 g *sulfanilamida* dengan 15 % CH_3COOOH (v/v) menjadi 150 ml. Saring jika dibutuhkan lalu pindahkan ke dalam botol gelap bertutup gelas
- c) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Nitrit;
Larutkan 1,000 g NaNO_2 dengan air suling dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- d) Larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ Nitrit;
Pipet 100 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Nitrit ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Nitrit;
Pipet 10 ml larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ Nitrit ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Larutan baku kerja Nitrit
Pipet masing-masing 10 ml, 20 ml, 30 ml, dan 40 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Nitrit ke dalam labu ukur 50 ml. Tambahkan 2,5 ml pereaksi sulfanilamida, dan aduk. Biarkan selama 5 menit, tambahkan 2,5 ml peraksi NED, aduk, encerkan sampai tanda garis dengan larutan hasil penyaringan, aduk dan biarkan 15 menit sampai terbentuk warna.

B.5.2 Peralatan

- a) Labu ukur 50 ml, 500 ml, dan 1000 ml;
- b) Gelas piala;
- c) Pengaduk gelas/kaca;
- d) Gelas ukur 10 ml;
- e) Pipet volumetrik 100 ml;
- f) Spektrofotometer;
- g) Pemanas listrik;
- h) Kertas saring;
- i) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

B.5.3 Cara kerja

- a) timbang 5 g contoh dengan teliti ke dalam gelas piala, tambahkan lebih kurang 40 ml H_2O bebas nitrit yang telah dipanaskan sampai suhu 80 °C, aduk dengan pengaduk kaca, kemudian pindahkan ke dalam labu ukur 500 ml, bilas gelas piala dengan air panas;
- b) tambahkan air panas ke dalam labu ukur hingga labu ukur berisi lebih kurang 300 ml, simpan di atas penangas air selama 2 jam sambil sekali-sekali di goyang.
- c) dinginkan pada temperatur ruang, encerkan sampai tanda garis, kocok, dan saring. Jika hasil penyaringan masih keruh, sentrifugasi sehingga diperoleh larutan jernih.
- d) pipet sejumlah larutan hasil penyaringan (diperkirakan mengandung NaNO_2 5 – 50 μg) dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml..
- e) tambahkan 2,5 ml pereaksi sulfanilamida, dan goyangkan labu. Biarkan selama 5 menit, tambahkan 2,5 ml peraksi NED, aduk, encerkan sampai tanda garis, aduk dan biarkan 15 menit sampai terbentuk warna.
- f) masukkan larutan ke dalam sel fotometer dan tetapkan serapannya pada panjang gelombang 540 nm.

- g) tetapkan blanko dengan menggunakan 45 ml H₂O, 2,5 ml pereaksi sulfanilamida, dan 2,5 pereaksi NED.
- h) hitung serapan contoh dengan menggunakan deret standar.

B.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar nitrit atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

B.6 Karbohidrat

B.6.1 Prinsip

Penetapan karbohidrat berdasarkan pengurangan total jumlah contoh dengan persentase kadar air, abu, protein, dan lemak

B.6.2 Cara kerja

B.6.2.1 Lakukan penetapan kadar air sesuai prosedur berikut:

B. 6.2.1.1 Prinsip

Bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 2 jam. Bobot yang hilang atau kadar air dihitung secara gravimetri.

B.6.2.1.2 Peralatan

- a) Desikator yang berisi desikan;
- b) Botol timbang dengan penutup;
- c) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

B.6.2.1.3. Cara kerja

- a) panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (botol timbang dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 1 g – 3 g contoh ke dalam botol timbang, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup botol disamping botol di dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama dua jam (dua jam setelah suhu oven 102 °C);
- d) tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, pindahkan segera kedalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo;
- f) hitung kadar air dalam contoh.

B.6.2.1.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

W_0 adalah bobot botol timbang kosong dan tutupnya, (g);

W_1 adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

W_2 adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, (g).

B.6.2.1.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

B.6.2.2 Lakukan penetapan kadar abu sesuai prosedur berikut:**B.6.2.2.1 Prinsip**

Bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih. Kadar abu dihitung secara gravimetri.

B.6.2.2.2 Peralatan

- desikator yang berisi desikan;
- cawan Pt yang berukuran 50 – 100 ml;
- oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- steam bath*;
- penangas listrik.

B.6.2.2.3 Cara kerja

- panaskan cawan dalam oven pada suhu (100 ± 2) °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- masukkan 5 g sampai 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu (100 ± 2) °C sampai H_2O hilang;
- tambahkan beberapa tetes minyak zaitun murni dan panaskan perlahan diatas api atau lampu IR sampai pengembangan berhenti;
- tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tungku pembakaran pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih;
- tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam *steam bath* kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik kemudian diabukan kembali pada suhu 525 °C sampai mencapai berat yang tetap;
- pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo;
- hitung kadar abu dalam contoh.

B.6.2.2.4 Perhitungan

$$\text{Kadar Abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

W_0 adalah bobot cawan kosong, (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah dikeringkan, (g).

B.6.2.2.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (*RSD*) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau *RSD* lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.6.2.3 Lakukan penetapan kadar lemak sesuai prosedur **B.3**.

B.6.2.4 Lakukan penetapan kadar protein sesuai prosedur **B.4**.

B.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Karbohidrat (\%)} = 100 \% - \% \text{ air} - \% \text{ abu} - \% \text{ protein} - \% \text{ lemak}$$

B.7 Cemarkan logam**B.7.1 Penetapan cemarkan logam timbal (Pb), tembaga (Cu), dan seng (Zn)****B.7.1.1 Prinsip**

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

B.7.1.2 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml – 100 ml;
- c) penangas listrik;
- d) kertas Whatman No. 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- f) spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu, Pb, dan Zn) terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- j) gelas piala 250 ml;
- k) penangas air.

B.7.1.3 Pereaksi

- a) larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- c) larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
Encerkan 7 ml HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida, HCl 6 N;
Encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 % dalam alkohol;
Larutkan 10 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cu;
Larutkan 1,000 g Cu dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- g) larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu;
Pipet 10 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cu ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu.
- h) larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ Cu;
Pipet 10 ml larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ Cu.
- i) larutan baku kerja Cu;
Pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml; 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,2 $\mu\text{g/ml}$; 0,4 $\mu\text{g/ml}$; 0,8 $\mu\text{g/ml}$; 1,4 $\mu\text{g/ml}$ dan 1,8 $\mu\text{g/ml}$ Cu.
- j) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb;
Larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- k) larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ Pb;
Pipet 5,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/ml}$.
- l) larutan baku kerja Pb;
Pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 ml dan 5 ml larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$; 2,0 $\mu\text{g/ml}$ dan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Pb.
- m) larutan baku Zn 1000 $\mu\text{g/ml}$.;
Larutkan 1,000 g Zn dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ini memiliki konsentrasi Zn 1000 $\mu\text{g/ml}$.
- n) larutan baku Zn 200 $\mu\text{g/ml}$;
Pipet 10,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Zn ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Zn 200 $\mu\text{g/ml}$.
- o) larutan baku Zn 20 $\mu\text{g/ml}$;

Pipet 10,0 ml larutan baku 200 µg/ml Zn ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi Zn 20 µg/ml.

p) larutan baku kerja Zn.

Pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 1 ml; 3 ml; 7 ml; 9 ml dan 10 ml larutan baku 20 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,6 µg/ml; 1,4 µg/ml; 1,8 µg/ml; dan 2,0 µg/ml Zn.

B.7.1.4 Cara kerja

- timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji terbakar dan tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml MgNO₃. 6H₂O 10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- lanjutkan pengabuan dalam tanur 500°C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N atau 5 ml HNO₃ 1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
- jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring Whatman No.41 ke dalam labu ukur 50 ml;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 324 nm untuk Cu, 283 nm untuk Pb dan 213,8 nm untuk Zn);
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- hitung konsentrasi logam dalam contoh.

B.7.1.5 Perhitungan hasil

$$\text{Konsentrasi logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11% maka analisis harus diulang

B.7.2 Penetapan timah (Sn)**B.7.2.1 Prinsip**

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian ditambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

B.7.2.2 Pereaksi

- a) larutan kalium klorida, 10 mg K /ml;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- b) asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- c) asam klorida pekat, HCl pekat;
- d) larutan baku 1000 mg/l Sn;
Larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) larutan baku kerja Sn.
Pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ Sn.

B.7.2.3 Peralatan

- a) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) erlenmeyer 250 ml;
- c) penangas listrik;
- d) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 $^{\circ}\text{C}$;
- e) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- f) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- h) gelas ukur kapasitas 50 ml;
- i) gelas piala 250 ml;
- j) penangas air.

B.7.2.4 Cara kerja

- a) timbang 5 g sampai 10 g contoh ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO_3 pekat, dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sampai sisa volume 3 ml sampai 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang.
- d) angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti.
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sampai sisa volume 10 ml sampai 15 ml.
- f) tambahkan 40 ml H_2O , aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml H_2O ;
- g) tambahkan 1,0 ml KCl , dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan H_2O , dan saring.
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$;

- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) hitung kandungan logam dalam contoh.

B.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11%, maka analisis harus diulang kembali.

B.7.3 Penetapan raksa (Hg)

B.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

B.7.3.2 Pereaksi

- a. asam sulfat, H_2SO_4 18 N;
- b. asam nitrat, HNO_3 7 N;
- c. batu didih;
- d. campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- e. hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- f. larutan molibdat 2 %.
- g. larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h. larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i. larutan pengencer;
masukkan 300 ml – 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j. larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Bisa digunakan larutan baku.
- k. larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Hg;

Pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.

- I. Larutan baku kerja Hg;
Pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 µg/ml; 0,005 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml Hg.

B.7.3.3 Peralatan

- a) Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- d) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- e) Labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- f) Penangas listrik;
- g) Gelas ukur 25 ml;
- h) Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.

B.7.3.4 Cara kerja

B.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 18 n, 20 ml HNO_3 7 n, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 – 6 batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 ml $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- j) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "hvg";
- k) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan ssa tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- l) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu x dan absorbans sebagai sumbu y;
- m) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- n) hitung konsentrasi hg dalam contoh.

B.7.3.4.2 Destruksi menggunakan digester microwave dengan sistim tertutup

- timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat.
- masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- hitung konsentrasi Hg dalam contoh.

B.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Hg (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.7.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi(RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

B.8 Cemarkan arsen (As)**B.8.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.8.2 Peralatan

- spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- labu Kjeldahl 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml.
- gelas ukur 25 ml
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.

B.8.3 Pereaksi

- a) asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) asam perklorat, HClO_4 pekat
- c) natrium boronhidrida, NaBH_4 ;
Larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- d) asam klorida, HCl 8 M;
Larutkan 66 ml HCl 37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
Timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37%. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) kalium iodida, KI 20 %;
Timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
Larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
Pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
- i) larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As;
Pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
- j) larutan baku kerja As;
Pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

B.8.4 Persiapan contoh**B.8.4.1 Pengabuan basah**

- a) timbang 5 g contoh dalam labu Kjeldahl dan tambahkan 20 ml H_2SO_4 pekat dan 15 ml HNO_3 pekat;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 10 ml HClO_4 sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;

B.8.4.2 Pengabuan kering

- a) timbang 5 g contoh dalam cawan dan tambahkan 2,5 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 25 ml HNO_3 pekat;
- b) aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering;

- c) abukan dalam tanur 500 °C selama 2 jam, dinginkan dan basahkan dengan HNO₃ pekat. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada 500 °C sampai didapat abu berwarna putih;
- d) larutkan dengan larutan HCl 1:3 dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;

B.8.4.3 Destruksi dengan *microwave* (sistem tertutup)

- a) timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

B.8.5 Cara kerja

- a) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- b) pipet 25 ml larutan destruksi dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- c) tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- d) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- e) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- f) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- g) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- h) hitung konsentrasi As dalam contoh.

B.8.6 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi arsen (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.8.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi(RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

B.9 Cemarkan mikroba

B.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji *Coliform*, dan *Staphylococcus aureus*

B.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.9.1.2 Larutan Pengencer

a) *Buffered Pepton Water* (BPW)

Pepton	10 g
Natrium klorida	5 g
<i>Disodium hydrogen phosphate</i>	3,5 g
<i>Kalium dihydrogen phosphate</i>	1,5 g
Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet 225 ml atau 450 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

B.9.1.3 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 8000 rpm – 45000 rpm;
- Neraca analitik kapasitas 2000 g dengan ketelitian 0,1 g
- Gelas piala steril
- Labu erlenmeyer steril
- Botol pengencer steril
- Pipet volumetrik steril
- Tabung reaksi
- Alat pembuka kaleng steril
- Pisau, garpu, sendok, gunting, dan spatula steril;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik.

B.9.1.4 Cara kerja

- Timbang 25 g contoh dan masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10.
- Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.9.2 Bakteri *coliform*

B.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

B.9.2.2 Peralatan

- a) Cawan petri gelas ukuran 15 x 100 mm atau plastik ukuran 15 x 90 mm, steril;
- b) Pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- c) Botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- d) Lemari pengering (Inkubator), (35 ± 1) °C;
- e) Tabung reaksi dan tabung Durham;
- f) Rak untuk tabung reaksi;
- g) Jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

B.9.2.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LST) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *Plate Count Agar (PCA)*;
- d) *Peptone Water*;
- e) *Buffer fields phosfat buffered dilution water (BPBDW)*.

B.9.2.4 Cara kerja**B.9.2.4.1 Presumptive test untuk Bakteri coliform (Uji Dugaan)**

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.9.1.4.
- b) Inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Laurylsulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik - 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) Masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) Amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- (24 ± 2) jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi (48 ± 2) jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri coliform untuk tabung-tabung yang negatif;
- g) Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

B.9.2.4.2 Confirmed Test untuk Bakteri coliform (Uji Penegasan)

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu (35 ± 1) °C selama (48 ± 2) jam;
- d) Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel 3., tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada (35 ± 1) °C;
- e) Laporkan sebagai APM bakteri coliform per gram.

Tabel B.1 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh

Tabung yang positif			APM/MPN	Tabung yang positif			APM/MPN
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

B.9.3 *Staphylococcus aureus* (Metode plate count)

B.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama (45 – 48) jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

B.9.3.2 Peralatan

- Spreader dari gelas
- Botol pengencer 500 ml
- Tabung reaksi
- Gelas ukur 1ml dan 10 ml
- Cawan petri diameter 90 mm – 100 mm dan 140 mm – 150 mm
- Gelas sediaan
- Inkubator 35 °C
- Pipet ukur

B.9.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- Baird-parker* agar
- Brain heart infusion broth* (BHIB)
- Plasma kelinci

B.9.3.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.8.1.4.
- Pipet 0,1 ml contoh dari setiap pengenceran ke atas permukaan *baird-parker* agar dan sebarkan merata dengan menggunakan spreader. Keringkan permukaan agar sebelum diinkubasi.
- Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai 48 jam.
- Pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus* yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya.

B.9.3.4 Uji koagulase

- Pindahkan koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 ml sampai 0,3 ml *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*.
- Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai 24 jam.
- Tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam kultur BHIB dan campur.
- Inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 36 °C ± 1°C selama 6 jam.
- Amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi.
- Hitung jumlah *Staphylococcus* dalam 1 g atau 1 ml contoh.

B.9.3.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F$
dengan:

n adalah jumlah koloni, (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.9.4 Clostridium perfringens**B.9.4.1 Prinsip**

Pertumbuhan *Clostridium perfringens* yang dapat mereduksi sulfat pada media selektif yang dicirikan oleh terbentuknya koloni berwarna hitam dan yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

B.9.4.2 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- Peptone water*
- Reagent nitrit*
- Buffered Glycerol Salt Solution*
- TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine)*
- D- Cycloserine Solution*
- Egg Yolk Emulsion*
- Buffered Motility Nitrat Medium*
- Sporulation Broth*
- Polypeptone Yeast Ekstrak (PY) Medium*
- Fluid Thioglycollate Medium*
- Lactose Gelatin*

B.9.4.3 Peralatan

- a) Pipet 1ml dan 10 ml terkalibrasi
- b) Alat penghitung koloni
- c) Blender
- d) Anaerobic Jar
- e) Tabung reaksi 150 x 16 mm , 125 x 16 mm, 100 x 15 mm
- f) Cawan Petri
- g) Inkubator terkalibrasi

B.9.4.4 Cara kerja**B.9.4.4.1 Uji duga**

- a) timbang 50 g contoh ke dalam blender yang steril secara aseptik. Tambahkan 450 ml *peptone water* dan homogenisasikan selama 2 menit pada kecepatan rendah (13000 rpm);
- b) Buat tingkat pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-6} menggunakan larutan pengencer *peptone water*. Contoh: untuk 10^{-2} : pindahkan 10 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam 90 ml *peptone water*;
- c) Tuang masing-masing 5 ml TSC Agar ke dalam 10 cawan petri, sebarkan dengan cepat dan ratakan;
- d) Pada saat agar telah membeku, pipet secara aseptik 1 ml contoh yang telah homogen dari masing-masing pengenceran secara duplo pada bagian tengah cawan petri;
- e) tuangkan kembali 15 ml TSC Agar tanpa *egg yolk* ke dalam Petri. Campur dengan baik dan putar dengan hati-hati;
- f) Atau dengan cara lain, dengan menggunakan tangkai penyebar, sebarkan 0,1 ml contoh diatas cawan petri yang berisi medium TSC Agar yang mengandung *egg yolk* ;
- g) Biarkan medium terserap oleh contoh 5 – 10 menit, kemudian lapisi dengan 10 ml TSC agar lagi, tanpa *egg yolk*;
- h) Pada saat agar telah membeku, tempatkan cawan petri didalam anaerobik jar. Kondisi diusahakan anaerobik dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 20 jam untuk TSC Agar tanpa *egg yolk* dan 35 °C selama 24 jam untuk TSC Agar dengan *egg yolk*;
- i) Setelah inkubasi selesai, pindahkan cawan petri dari jar dan amati secara visual untuk pertumbuhan dan adanya koloni berwarna hitam;
- j) Pilih cawan cawan petri yang menunjukkan perkiraan 20 koloni sampai 200 koloni hitam, dan hitung jumlah *Clostridium* spp/gr contoh;
- k) *Clostridium perfringens* di dalam medium yang mengandung *egg yolk* berwarna hitam dan biasanya disekelilingnya memiliki zona putih sepanjang 2 mm sampai 4 mm sampai mempunyai aktifitas lesitin. Akan tetapi beberapa strain lemah atau negatif lesitin

B.9.4.4.2 Uji Penegasan

- a) Pilih 10 koloni dari cawan Petri yang mengandung (20 – 200) koloni, inokulasikan masing-masing ke dalam tabung *Fluid Thioglycollate medium* dan inkubasikan selama 18 jam sampai 24 jam pada suhu 35 °C
- b) Buat pewarnaan gram dari kultur *Fluid Thioglycollate medium* dan cek kemurniannya. *Clostridium perfringens* mempunyai bentuk batang pendek, tebal, gram positif.
- c) Streak kultur dari TSC Agar yang mengandung *egg yolk* dan inkubasikan cawan petri pada suasana anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C untuk mendapatkan kultur murni
- d) Inokulasikan pada *Buffered motility nitrat* dan *Lactose gelatin* media sepanjang 2 mm dari kultur *Fluid Thioglycollate* atau yang diisolasi dari TSC Agar
- e) Inokulasikan 1ml pada *sporulation broth* yang diambil dari *Fluid Thioglycollate medium* dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C

- f) Uji tabung-tabung *Buffered Motility Nitrat Medium* dengan lampu pemancar untuk melihat pertumbuhan sepanjang tusukan. *Clostridium perfringens* adalah organisme non motil, tumbuh hanya didalam dan sepanjang garis tusukan, sedangkan organisme motil tumbuh menyebar keluar di dalam medium menjauhi tusukan
- g) Uji *Buffered Motility nitrat medium* untuk adanya reduksi nitrat, dengan menambahkan 0,5 ml reagent A dan 0,2 ml reagent B. Warna oranye dalam waktu 15 menit menunjukkan adanya nitrat, jika tidak ada perubahan warna tambahkan beberapa butir serbuk Zn dan tunggu 10 menit. Jika tetap tidak ada perubahan warna setelah ditambahkan serbuk Zn menunjukkan bahwa nitrat telah tereduksi. Perubahan kewarna oranye menunjukkan bahwa organisme tidak mampu mereduksi nitrat
- h) Uji Lactose Gelatin medium untuk timbulnya gas dan perubahan warna dari merah ke kuning, menunjukkan bahwa Lactose terfermentasi dengan memproduksi asam
- i) Buat pewarnaan gram dari sporulation broth dan uji secara mikroskopik untuk sporanya. Jika tidak terbentuk spora, maka laporkan tidak memproduksi spora. Simpan kultur spora pada 4°C jika ingin menguji lebih lanjut
- j) Identifikasi *Clostridium perfringens* adalah non motil, bentuk batang, gram positif dengan memproduksi koloni berwarna hitam di dalam TSC agar, mereduksi nitrat menjadi nitrit, menghasilkan asam dan gas dari uji lactose Gelatin akan mencair dalam waktu 48 jam.

B.9.4.5 Perhitungan

Hitung Jumlah *Clostridium perfringens* di dalam contoh uji dengan dasar persentase (%) dari koloni yang betul-betul *Clostridium perfringens*. Contoh: Jika rata-rata dari pengenceran 10^{-4} ada 85 koloni yang diduga *Clostridium perfringens* dan dari 8 koloni yang diuji adalah betul-betul *Clostridium perfringens*, maka jumlah *Clostridium perfringens* / g contoh adalah $85 \times (8/10) \times 10.000 = 680.000$

B.9.5 *Clostridium botulinum*

B.9.5.1 Prinsip

Pertumbuhan *Clostridium Botulinum* pada cooked meat medium yang kemudian diamati adanya kekeruhan, produksi gas dan bau. Secara mikroskopis menghasilkan Gram positif dengan spora oval subterminal.

B.9.5.2 Peralatan

- a) Pembuka kemasan;
- b) Anaerobik Jars;
- c) Cawan Petril;
- d) Tabung reaksi;
- e) Mikroskop;
- f) Pipet;
- g) Pinset/penjepit;
- h) Inkubator terkalibrasi;
- i) Refrigerator;
- j) Mortar;
- k) Loop/ose;
- l) Gelas kultur;
- m) *Lyophilized*;

B.9.5.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Cooked Meat Broth* (Gunakan salah satu *liver* atau *heart medium*)
 - *Chopped Liver Broth*
 - *Cooked Meat medium*
- b) *Trypticase Peptone Glucose Yeast Ekstrak (TPGY) Broth* atau dengan *Trypsin (TPGYT)*
- c) *Liver Veal Egg Yolk Agar* atau *Anaerobik Egg Yolk Agar*
 - *Liver Veal Egg Yolk Agar (LVEY)*
 - *Anaerobik Egg Agar*
- d) *Gel Phosphate Buffer*
- e) *Alkohol absolut steril*
- f) Pewarnaan Gram.

B.9.5.4 Cara Kerja

B. 9.5.4.1 Uji Pendahuluan

Simpan contoh uji didalam kulkas. Tidak diperbolehkan membuka makanan yang dikalengkan kecuali dalam keadaan rusak, menggelembung dan didalamnya berbahaya yang dapat meledak, tidak diperlukan untuk disimpan didalam kulkas

a) Makanan Padat

Pindahkan secara aseptik dengan sedikit atau yang terbebas dari cairan ke dalam mortar steril. Tambahkan *Gel Phosphate Buffer Steril*. Atau dengan cara lain, inokulasikan sebagian kecil contoh uji dengan gunting tang ke dalam *Enrichment broth*

b) Makanan Cair

Inokulasikan contoh dengan pipet steril yang dituangkan kedalam *Enrichment Broth*.

c) Makanan Kaleng

Contoh dibersihkan dengan larutan alkohol-iodine kemudian kaleng dibuka

B.9.5.4.2 Uji visual

Penampilan, bau, adanya tanda kebusukan. Produk jangan dirasakan dibawah keadaan sekitar

B.9.5.4.3 Uji cadangan

Secara aseptik, kultur dipindahkan ke *jars* yang steril untuk uji berikutnya yang mungkin diperlukan

B.9.5.4.4 Deteksi *Clostridium botulinum*

a) Uji Pengkayaan

Hilangkan oksigen dari media yang akan dipakai sebelum diinokulasi, dengan cara memanaskan media tersebut selama 10 menit sampai 15 menit dan didinginkan dengan cepat tanpa bergejolak. Inokulasikan 2 tabung yang berisi *Cooked Meat Broth* dengan 1 gr sampai 2 gr contoh padatan atau 1 ml sampai 2 ml makanan cairan atau ekstrak/15 ml

media. Inkubasikan pada 35 °C. Dengan cara yang sama inokulasi 2 tabung dengan media TPGY dan diinkubasi pada 26 °C.

b) Pengujian

Setelah 5 hari diinkubasi, uji kultur dengan turbidimetri, adanya produksi gas, pencernaan partikel daging dan bau busuk. Juga pengujian mikroskopik dengan fase kontras dengan pewarnaan gram, kristal violet atau biru methilin

c) Perlakuan Selanjutnya

Biasanya setelah 5 hari inkubasi menghasilkan pertumbuhan yang subur dan konsentrasi toxin yang tinggi dengan puncak spora yang baik. Kultur dikembalikan ke dalam kulkas untuk isolasi kultur murni. Jika dalam waktu 5 hari tidak ada pertumbuhan, inkubasi ditambahkan sampai 10 hari untuk melihat adanya germinasi spora *Clostridium botulinum* sebelum dihancurkan secara steri.

B.9.5.4.5 Isolasi kultur murni

Jika spora tumbuh baik, *Clostridium botulinum* dapat diisolasi dengan baik dari campuran flora didalam kultur pengkayaan atau contoh aslinya.

a) Perlakuan Awal

Tambahkan dengan volume yang sama alkohol *absolute steril* ke dalam 1 ml sampai 2 ml kultur atau contoh ke dalam tabung yang bertutup ulir. Campur dengan baik dan inkubasikan pada temperatur kamar selama 1 jam. Cara lain, Panaskan 1 ml sampai 2 ml kultur pengkayaan selama 10 menit sampai 15 menit pada suhu 80°C untuk mematikan sel vegetatif.

(Jangan kerjakan pemanasan untuk *Clostridium botulinum* type non proteolitik)

b) Plating

Dengan loop inokulasi, streak 1/2 loop penuh dengan kultur ke dalam cawan Petri berisi media *Liver Veal Egg Yolk* atau *Anaerobik Egg Yolk Agar* atau keduanya untuk mendapatkan isolasi koloni. Inkubasikan cawan Petri selama 48 jam pada suhu 35°C dibawah kondisi anaerobik dalam anaerobik jar atau gas pak atau yang setara.

c) Seleksi koloni

Koloni tipikal akan tumbuh menumpuk atau membentuk permukaan datar yang halus atau kasar dan biasanya menunjukkan penyebaran yang tidak beraturan ditepinya. Pada media *Egg Yolk* koloni biasanya menunjukkan permukaan yang berwarna warni saat diuji dengan lampu. Daerah ini biasa dikenal dengan lapisan bermutiara. Daerah ini biasanya meluas dan mengikuti bentuk garis dari koloni yang tidak beraturan tadi. Selain daerah seperti mutiara, koloni tipe C,D, dan E biasanya dikelilingi daerah endapan berwarna kuning selebar 2 mm sampai 4 mm, sedangkan koloni tipe A dan B umumnya menunjukkan daerah endapan yang lebih pendek. Tidak semua tipe koloni menghasilkan toxin, beberapa keluarga genus *Clostridium botulinum* mempunyai sifat bentuk yang khas tetapi tidak menghasilkan toxin

d) Kultur

Dengan menggunakan loop steril, inokulasikan setiap 10 koloni terseleksi kedalam tabung medium steril:

1. TPGY Broth untuk *Clostridium botulinum* tipe E, inkubasikan 5 hari pada suhu 26 °C dan
 2. Cooked Meat Broth untuk toxin tipe lain, inkubasikan selama 5 hari pada suhu 35 °C.
- Gunakan kultur untuk uji penegasan dan deteksi serta identifikasi toxin.

e) Penegasan

Streak kultur dari langkah D secara duplo pada cawan petri yang berisi media *Egg Yolk Agar*. Inkubasikan salah satu petri tersebut secara anaerob dan petri yang lain secara aerobik pada suhu 35 °C. Jika koloni *Clostridium botulinum* tumbuh pada cawan Petri yang anaerobik dan tidak tumbuh pada yang aerobik maka kultur tersebut murni. Kesalahan isolasi *Clostridium botulinum* dari koloni yang terseleksi menunjukkan bahwa populasi relatifnya terhadap campuran flora rendah. Ulangi tahapan pemindahan melalui tahap tambahan pengkayaan. E(A)/Deteksi *Clostridium botulinum*. Ini mungkin akan meningkatkan jumlah koloni yang cukup untuk isolasi. Simpan Kultur Murni didalam kulkas, pada gelas kultur/glass beads atau lyophilized.

B.9.6 Bakteri aerob termofilik pembentuk spora

B.9.6.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri termofilik berspora yang penting sebagai agen pembusuk di dalam makanan dengan tingkat keasaman rendah. Contoh bakteri asam rendah adalah: *Bacillus stearothermophilus*.

B.9.6.2 Peralatan

- a) Pipet;
- b) Gelas ukur;
- c) Erlenmeyer 250 ml;
- d) Timbangan;
- e) Inkubator terkalibrasi;
- f) Autoklaf terkalibrasi;
- g) Pembuka kemasan.

B.9.6.3 Pereaksi

- a) Glukosa tryptone agar
- b) Dextrose tryptone;
- c) Air steril

B.9.6.4 Cara kerja

B.9.6.4.1 Persiapan contoh

- a) Timbang 20 g contoh uji dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml steril.
- b) Tambahkan air steril sampai tanda garis, dan rebus selama 5 menit menggunakan penangas air kemudian dinginkan;
- c) Dengan menggunakan pipet steril, pipet masing-masing 2 ml dan masukkan ke dalam 5 (lima) cawan steril kemudian tutup;
- d) Campurkan inokulum dengan *glukosa peptone* agar dan inkubasi pada suhu 55 °C selama 35 jam – 48 jam.

B.9.6.4.2 Identifikasi

Berbentuk bulat, diameter 1 mm sampai 5 mm dengan bagian tengahnya umumnya berwarna buram dan dikelilingi daerah berwarna kuning dengan latar belakang ungu. Lingkaran cahaya ini akan hilang dengan adanya bakteri penghasil asam rendah (*flat sour*) tertentu atau seluruh cawan akan berwarna kuning jika cawan ditumbuhi tunas yang tebal. Koloni yang umum yang tumbuh di bawah permukaan secara umum organisme asam rendah (*flat sour*), goreskan koloni pada cawan agar untuk menentukan karakteristik permukaan. Jika ragu dalam mengenal asam rendah (*flat sour*) yang tumbuh di bawah permukaan, amati sifat dasar dari permukaan koloni. Jika koloni menunjukkan kemurnian yang wajar dari flora yang terbentuk, anggaplah bahwa koloni di bawah permukaan itu telah terbentuk oleh kelompok bakteri yang sejenis. Jika cawan menghasilkan dalam jumlah banyak, hitungan mungkin tidak bisa teliti, struktur dan ukuran koloni bisa menjadi menyimpang. Jika cawan ditumbuhi tunas yang banyak sehingga perhitungan sulit dilakukan, encerkan larutan pertama dan ulangi prosedur diatas.

B.9.6.5 Perhitungan

Jumlah koloni pada 5 cawan petri merupakan jumlah spora dalam 2 g contoh (20 g contoh dilarutkan sampai volume 100 ml, 10 ml larutan dituang dalam petri) kemudian dikalikan 5 untuk mendapatkan jumlah spora/10 g contoh.



Bibliografi

- CODEX Alimentarius Commission. 1996. CODEX Standard For Corned Beef. CODEX STAN 88-1981.
- CODEX Alimentarius Commission. 1996. FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Foods (AQL-6.5). CAC/RM 42-1969
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 983.18, Meat and Meat Product, Preparation of Test Sample, 17th edition, Chapter 39.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 991.36, Meat and Meat Product, Fat (Crude) in Meat and Meat Products, 17th edition, Chapter 39.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 928.08, Nitrogen in Meat, 17th edition, Chapter 39.1.15.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 973.31, Nitrites in Cured Meat, 17th edition, Chapter 39.1.21.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method, 17th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 17th edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 971.21, Mercury in Food, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 17th edition, Chapter 9.2.22.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. 8th edition. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. *Staphylococcus aureus*. 8th edition. Chapter 12.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 976.30, *Clostridium perfringens*, Microbiological Method, Method, 17th edition, Chapter 17.7.02.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2000. *Clostridium botulinum*. 9th edition. Chapter 17.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 972.45, Thermophilic Bacterial Spores in Sugars, Microbiological Method, Method, 17th edition, Chapter 17.6.03.





BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id